



КЛИНИЧЕСКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ АЛЬФА- И БЕТА-ДЕФЕНЗИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ У БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

Ильяшенко М.Г.¹, Тарасова Г.Н.², Бурцев Д.В.²

¹ МБУЗ КДЦ «Здоровье», Ростов-на-Дону

² ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России»

Ильяшенко Мария Георгиевна

E-mail: maha-03@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: определить зависимость содержания альфа- и бета-дефензинов в биологических средах от распространенности и активности воспалительного процесса при язвенном колите (ЯК).

Материалы и методы. Исследование проведено на 63 больных ЯК со средней степенью активности и 25 практически здоровых людей. В зависимости от распространенности процесса в кишечнике выделяли три группы больных: 1-я группа ($n = 18$) — дистальная форма ЯК, 2-я группа ($n = 24$) — левосторонняя локализация патологического процесса и 3-я группа ($n = 21$) — тотальная форма ЯК. Содержание β -дефензинов в кале и α -дефензинов в крови определяли методом иммуноферментного анализа.

Результаты. В контрольной группе уровень β -дефензина в кале составил $32 \pm 3,7$ нг/г, α -дефензина в крови — $71,7 \pm 3,8$ нг/мл. У пациентов 1-й группы концентрация β -дефензина в кале была $218,5 \pm 8,2$ нг/г, во 2-й группе — $210,8 \pm 4,3$ нг/г и в 3-й группе — $261,7 \pm 9,2$ нг/г. Средний уровень α -дефензина в крови соответствовал в 1-й группе — $471,8 \pm 9,9$ нг/мл, во 2-й группе — $853,5 \pm 9,5$ нг/мл и в 3-й группе — $479,3 \pm 6,8$ нг/мл. Вне зависимости от локализации поражения в кишке, исключая β -дефензин в кале во 2-й группе, концентрация антимикробных пептидов при ремиссии снижалась.

Заключение. Доказана ассоциация повышенной экспрессии альфа- и бета-дефензинов с активностью и протяженностью воспалительного процесса в кишке при ЯК.

Ключевые слова: язвенный колит; дефензины; рецидив; распространенность воспаления

SUMMARY

Objective: to determine the dependence of alpha-and beta-defensins in biological environments and prevalence of inflammatory process, activity bei patienten ulcerative colitis (UC).

Materialien und methoden: the study was conducted on 63 patients with moderate activity UC and 25 practically healthy people. Depending on the extent of the gut was isolated by the three groups of patients: group 1 ($n = 18$) — distal form, group 2 ($n = 24$) — left-hand localization of pathological process and group 3 ($n = 21$) — total form UC. Content of β -defensins in the stool and α -defensins in blood by method of the immune-enzyme analysis.

Results: in the control group the level of β -defensins in the stool was 3.7 ± 3.2 ng/g, α -defensins in blood — 71.7 ± 3.8 ng/ml. In patients of group 1 the concentration of β -defensins in the stool was 218.5 ± 8.2 ng/g in 2 group — 210.8 ± 4.3 ng/g and in group 3 — 261.7 ± 9.2 ng/g. Intermediate level α -defensins in blood match in group 1 — 471.8 ± 9.9 ng/ml in group 2 — 853.5 ± 9.5 ng/ml and in group 3 — 479.3 ± 6.8 ng/ml. Regardless of the localization of lesions in the gut, not including β -defensin in the stool at 2 under, the concentration of antimicrobial peptides in remission.

Conclusion: proven association increased expression of alpha-and beta-defensins with activity and a length of inflammation in the intestine at UC.

Keywords: ulcerative colitis; defensins; relapse; the prevalence of inflammation

ВВЕДЕНИЕ

Распространенность и социально активный возраст больных, тяжесть течения, трудности в терапии воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) определяют медико-социальное значение этой проблемы в современной гастроэнтерологии [1].

В понимании патогенеза ВЗК достигнут определенный прогресс. Известно, что слизистая оболочка кишечника осуществляет роль естественного барьера между внешней и внутренней средой организма, постоянно контактирует с микрофлорой. Установлено, что ВЗК являются следствием ослабленной защиты против внедряющихся в слизистую оболочку бактерий. Этому обстоятельству способствует генетическая предрасположенность и одновременно патологическая реакция иммунной системы на антигены нормальной (комменсальной) флоры кишечника [3]. Функциональные нарушения слизистого барьера благоприятствуют развитию хронического патологического процесса. Одним из факторов, определяющих состояние барьера слизистой оболочки, является группа протеинов, объединяемых термином «дефензины» [4]. Дефензины представляют собой высокопотентные естественные антибиотики организма, относятся к группе антимикробных пептидов. В тонкой кишке продуцируются альфа-дефензины HD5 и HD6, в толстой — многие бета-дефензины [5]. Как полагают, дефензины образуют «первую линию защиты» слизистой, которая предохраняет организм от широкого спектра микроорганизмов. Дефензины действуют антибактериально, связываясь с наружной оболочкой бактерий и образуя в ней микропоры, что в итоге нарушает ее целостность и ведет к гибели микроорганизма. Дефензины обезвреживают грамотрицательные и грампозитивные бактерии, кислотоустойчивые палочки, грибковые микроорганизмы, вирусы и простейшие [6]. В последние годы были выявлены новые аспекты в действии альфа-дефензина HD6 на микрофлору кишки. Методом поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени H. Chu et al. (2012) удалось проследить за прикреплением HD6 к белкам на поверхности микробной клетки и образованием сети волокон [7]. Этот дефензин закрепляется на поверхности микробов и самостоятельно создает обволакивающую сеть вокруг бактерий, в том числе и патогенных микроорганизмов, таких как сальмонелла и иерсиния, а также грибов и простейших паразитов. Всё это делает кишечник защищенным от потенциальных угроз

Целью настоящего исследования явилось изучение зависимости содержания альфа- и бета-дефензинов в биологических средах от распространенности и активности воспалительного процесса при язвенном колите (ЯК). Актуальность работы в этом направлении определяется возможностью разработки рекомендаций по мониторингу эндогенных антимикробных пептидов в кале для прогнозирования

рецидивов заболевания и определения площади распространения воспалительного поражения толстой кишки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническое исследование проведено на 63 больных ЯК в фазе рецидива заболевания. На первом этапе выполнялся скрининг больных с ЯК и включение их в программу исследования. Критериями включения больных в исследование являлись: пациенты обоюбого пола любой расы в возрасте от 16 до 70 лет; верифицированный диагноз ЯК с длительностью заболевания не менее 1 года и наличием не менее 2 рецидивов в анамнезе (анализ частоты рецидивов проведен по данным медицинской документации); информированное согласие пациента.

В зависимости от локализации воспалительного процесса в кишечнике и активности заболевания выделены три исследовательские группы: 1-я группа — 18 пациентов с дистальной формой ЯК, протекающей в виде проктосигмоидита со средней степенью активности; 2-я группа — 24 пациента с ЯК левосторонней локализацией патологического процесса и средней степенью активности; 3-я группа — 21 пациент с тотальной формой ЯК и средней степенью активности.

На втором этапе исследования больным проводилось специальное лабораторное обследование, включающее определение факторов врожденного антимикробного иммунитета. Контрольная группа была сформирована из 25 здоровых лиц, у которых после комплексного обследования не выявлено клинических маркеров патологии желудочно-кишечного тракта.

После забора биологического материала для проведения специального лабораторного обследования всем больным ЯК назначалась терапия, регламентируемая стандартом специализированной медицинской помощи. Оценка эффективности проводимой терапии проводилась на 4, 8 и 12-й неделе лечения, используя клинические и эндоскопические индексы активности ЯК (Rachmilewitz, Mayo). При достижении клинико-эндоскопической ремиссии заболевания больным повторно проводилось специальное лабораторное обследование, позволяющее оценить влияние стандартной терапии на систему врожденного антимикробного иммунитета.

Третий этап исследования включал аналитическую оценку полученных результатов по содержанию альфа-дефензинов в крови и бета-дефензинов в кале в клинических группах исходно и в динамике базисной терапии. С помощью ROC (Receiver Operating Characteristic) анализа выявлялись диагностические точки разделения для антимикробных пептидов, показатели которых были использованы для формирования прогноза раннего рецидива заболевания.

Содержание дефенинов в плазме крови определяли с помощью иммуноферментного анализа. При этом использовали набор реагентов для определения альфа-дефенина 1–3 (НВТ, Нидерланды). Количественное определение содержания бета-дефенина в образцах кала проводили также иммуноферментным анализом (ELISA) с помощью стандартного набора (*BCM Diagnostics*, США).

В работе исследованные величины были представлены в виде выборочного среднего значения и стандартной ошибки средней величины. Достоверность различий средних величин независимых выборок оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента при нормальном законе распределения и непараметрического критерия Манна—Уитни при отличии распределения показателей от нормального. Проверку на нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Кроме того, оценку диагностической эффективности тестов проводили с помощью анализа ROC-кривых и определения площади под ROC-кривой (*Area Under Curve*, AUC). Площадь под ROC-кривой — полезный обобщенный показатель качества диагностического теста. Чем больше значение AUC, тем «лучше» способность диагностического теста распознавать наличие и отсутствие болезни.

Статистический анализ результатов исследования проводился с помощью программы *Statistica 7.0* (*StatSoft Inc.*, США), *MedCalc* (версия 9.3.5.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходно у больных ЯК была определена средняя степень активности заболевания. Течение заболевания у пациентов было хроническим и рецидивирующим. По анамнезу заболевания основным клиническим жалобам, эндоскопическим характеристикам повреждения слизистой толстой кишки, кроме локализации и протяженности поражения, больные трех групп практически не отличались. Содержание дефенинов в крови и кале у больных ЯК по сравнению с контрольной группой и в зависимости от локализации поражения кишки представлено в *табл. 1*.

Самый высокий уровень β -дефенина в кале наблюдался у пациентов 3-й группы с тотальным

ЯК. Содержание дефенина в кале в 3-й группе достоверно превышало нормальный уровень в контрольной группе в 8,2 раза ($p < 0,001$), концентрацию показателя в 1-й группе — на 19,8% ($p < 0,05$) и во 2-й группе — на 24,1% ($p < 0,05$). Концентрация β -дефенина в кале у пациентов 1-й и 2-й групп была сопоставимой ($p > 0,05$). β -дефенин в кале у больных 1-й группы превышал аналогичный показатель в контрольной группе в 6,8 раза ($p < 0,001$), а во 2-й группе по сравнению с контролем — в 6,6 раза ($p < 0,001$).

Выше других уровень α -дефенина в крови наблюдался у пациентов 2-й группы с левосторонней локализацией ЯК. Содержание α -дефенина в крови во 2-й группе превышало уровень показателя в контрольной группе в 11,9 раза ($p < 0,001$), величину аналогичного показателя в 1-й группе — на 80,9% ($p < 0,05$) и в 3-й группе — на 78,1% ($p < 0,05$). Концентрация α -дефенина в крови у пациентов 1-й и 3-й групп была близкой по величине ($p > 0,05$). α -дефенин в крови у больных 1-й группы превышал аналогичный показатель в контрольной группе в 6,6 раза ($p < 0,001$), а в 3-й группе по сравнению с контролем — в 6,7 раза ($p < 0,001$).

Таким образом, концентрация антимикробных пептидов у больных ЯК при средней степени активности заболевания вне зависимости от локализации поражения кишки резко возрастала по сравнению с нормой. Наиболее высокое содержание β -дефенина в кале наблюдалось в 3-й группе с тотальным ЯК, α -дефенина в крови — во 2-й группе с левосторонней локализацией поражения.

У больных 1-й группы через 8 недель лечения одновременно клиническая и эндоскопическая ремиссия по индексам Рахмилевича были достигнуты в 50% ($n = 9$), а через 12 недель лечения — у всех больных (100%). Во 2-й группе через 8 недель количество больных, достигших клинко-эндоскопической ремиссии, было меньшим по сравнению с 1-й группой и составило 16,7% ($n = 4$). Однако через 12 недель лечения все больные (100%) находились в состоянии клинко-эндоскопической ремиссии заболевания. У больных 3-й группы через 8 недель лечения ремиссия заболевания была достигнута всего у одного больного (4,8%). Только через 12 недель лечения заболевание в 100% наблюдений удалось перевести в неактивную фазу. Итак, через 12 недель

Таблица 1

СОДЕРЖАНИЕ ДЕФЕНИНОВ В КАЛЕ И КРОВИ ($M \pm m$) В КЛИНИЧЕСКИХ ГРУППАХ ПРИ СРЕДНЕЙ АКТИВНОСТИ ЯК РАЗНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ И У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ				
Показатель	1-я группа, $n = 18$	2-я группа, $n = 24$	3-я группа, $n = 21$	Контрольная группа
β -дефенин в кале, нг/г	218,5 \pm 8,2*	210,8 \pm 4,3*	261,7 \pm 9,2*°	32 \pm 3,7
α -дефенин в крови, нг/мл	471,8 \pm 9,9*	853,5 \pm 9,5*	479,3 \pm 6,8*°	71,7 \pm 3,8

Примечание: * — достоверные различия по сравнению с контрольной группой; *° — по сравнению с 1-й группой; ° — по сравнению со 2-й группой при $p < 0,05$.

лечения у всех пациентов была достигнута клинико-эндоскопическая ремиссия ЯК, что позволило на следующем этапе определить уровень дефензинов уже в состоянии ремиссии.

Содержание антимикробных пептидов в кале и крови у больных клинических групп при достижении ремиссии представлено в *табл. 2*.

В 1-й группе при достижении ремиссии по сравнению со средней активностью заболевания β -дефензин в кале снизился на 72,4% ($p < 0,001$), α -дефензин в крови — на 63,8% ($p < 0,001$). Во 2-й группе при достижении ремиссии β -дефензин в кале практически не снижался, α -дефензин в крови снижался на 80,7% ($p < 0,001$). В 3-й группе при достижении ремиссии по сравнению со средней активностью заболевания β -дефензин в кале снижался на 66,8% ($p < 0,001$), α -дефензин в крови — на 63% ($p < 0,001$). Вне зависимости от локализации поражения в кишке, исключая β -дефензин в кале во 2-й группе, концентрация антимикробных пептидов при ремиссии снижалась. Наиболее выраженное снижение для β -дефензина в кале было установлено в 1-й группе, для α -дефензина в крови — во 2-й группе.

Дисперсионный анализ позволил оценить влияние распространенности воспалительного процесса в трех группах больных ЯК на изменение антимикробных пептидов в состоянии средней активности заболевания и его ремиссии. При средней активности заболевания фактор Фишера F был выше критического уровня для α -дефензина в крови ($F = 8,19, p < 0,001$), а при ремиссии — для β -дефензина в кале ($F = 5,62, p = 0,004$). Следовательно, распространенность воспалительного процесса в кишке от проктосигмоидита до левосторонней локализации и тотальной формы оказывала влияние на изменение α -дефензина в крови при активации заболевания и β -дефензина в кале при ремиссии болезни.

Проведение ROC-анализа колебания антимикробных пептидов в кале и крови у пациентов с ВЗК при активном течении болезни по сравнению со здоровыми людьми позволило выявить диагностические точки разделения концентраций изучаемых факторов, при достижении которых повышается

риск развития ВЗК и в последующем — их обострения.

При анализе содержания β -дефензина в кале у больных ЯК и у здоровых людей было установлено, что диагностической точкой разделения, при превышении которой повышается риск развития ВЗК, была концентрация 42 нг/г. На *рис. 1 на цветной вклейке* представлена ROC-кривая (соотношение чувствительности и специфичности) для прогнозирования развития ВЗК по уровню β -дефензина кала.

При достижении концентрации β -дефензина кала более 42 нг/г диагностическая чувствительность в отношении прогноза ВЗК составила 80%, а диагностическая специфичность — 93,75%. Площадь под ROC-кривой (AUC), отражающая диагностическую значимость теста, составила 0,888 (z statistic = 6,45 при $p < 0,0001$), что свидетельствовало о хорошей способности диагностического теста распознавать наличие или отсутствие болезни.

При анализе содержания α -дефензина в крови у больных ЯК и у здоровых людей было установлено, что диагностической точкой разделения, при превышении которой повышается риск развития ВЗК, была концентрация 93 нг/мл. На *рис. 2 на цветной вклейке* представлена ROC-кривая для прогнозирования развития ЯК по уровню α -дефензина крови.

При достижении концентрации α -дефензина крови более 93 нг/мл диагностическая чувствительность в отношении прогноза развития ЯК составила 61%, а диагностическая специфичность — 81%. Площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,71 (z statistic = 4,48 при $p = 0,02$), что свидетельствовало об удовлетворительной способности диагностического теста распознавать наличие или отсутствие болезни.

При проведении ROC-анализа были определены диагностические точки разделения для уровней β -дефензина и α -дефензина с целью дифференцирования состояний рецидива болезни и ремиссии. У больных с ВЗК рецидив развивался при превышении содержания β -дефензина в кале более 213 нг/г (диагностическая чувствительность — 78%, диагностическая специфичность — 85%), α -дефензина

Таблица 2

СОДЕРЖАНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В КАЛЕ И КРОВИ (M ± m) У БОЛЬНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ГРУПП В ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ					
Группа	Показатель	Рецидив	Ремиссия	Δ	p
1, n = 18	β -дефензин в кале, нг/г	218,5 ± 8,2	60,4 ± 8,5	158,3 ± 17,3	< 0,001
	α -дефензин в крови, нг/мл	471,8 ± 9,9	170,6 ± 4,6	300,9 ± 22,9	< 0,001
2, n = 24	β -дефензин в кале, нг/г	210,8 ± 4,3	200,2 ± 7,5	9,4 ± 0,7	0,352
	α -дефензин в крови, нг/мл	853,5 ± 9,5	164,7 ± 5,7	838,9 ± 45,2	< 0,001
3, n = 21	β -дефензин в кале, нг/г	261,7 ± 9,2	87 ± 4,3	174,5 ± 6,9	< 0,001
	α -дефензин в крови, нг/мл	479,3 ± 6,8	177,5 ± 8,6	301,8 ± 48,9	< 0,001

в крови — более 312 нг/мл (диагностическая чувствительность — 71%, диагностическая специфичность — 88%).

Таким образом, повышение содержания эндогенных антимикробных пептидов дефензинов у больных ЯК ассоциировано с обострением заболевания, распространением воспалительного процесса в кишечнике и может быть использовано как диагностические тесты для текущего мониторинга и прогнозирования состояния больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дефензины относятся к иммунозащитным пептидам и продуцируются иммунной системой большинства многоклеточных организмов, играют главную роль как молекулы-эффекторы врожденного иммунитета [8]. Дефензины обладают широким спектром биологических свойств от прямого убивания проникающего патогена до модулирования иммунных и других биологических реакций организма-хозяина. Дефензины выполняют важные функции во многих клинически значимых патологических процессах [9]. В нашей работе была доказана ассоциация несбалансированной экспрессии альфа- и бета-дефензинов с активностью и продолжительностью воспалительного процесса в кишке при ЯК. Концентрация дефензинов у больных ЯК

при средней степени активности заболевания вне зависимости от локализации поражения кишки резко возрастала по сравнению с нормой. Наиболее высокое содержание β -дефензина в кале наблюдалось у пациентов с тотальным ЯК, α -дефензина в крови — у больных с левосторонней локализацией поражения.

Патогенетическое значение дефензинов при развитии воспаления в кишке изучено, широко обсуждаются потенциальные возможности их использования в качестве натуральных противомикробных соединений, а также как моделей для разработки новых синтетических антибиотиков и иммунорегулирующих препаратов [10]. Однако практическому врачу важно знать, какие уровни дефензинов сопряжены с развитием, а затем с рецидивом ЯК. Проведенный ROC-анализ позволил выявить диагностически значимые уровни дефензинов в крови и кале для прогноза развития и рецидива заболевания.

Учитывая установленную зависимость между содержанием дефензинов в биологических средах и активностью заболевания у больных ЯК, можно рекомендовать мониторинг эндогенных антимикробных пептидов в крови и кале для прогнозирования обострения заболевания и определения площади распространения воспалительного поражения кишки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колодей, Е.Н. Язвенный колит и рак толстой кишки: актуальные и нерешенные вопросы диагностики / Е.Н. Колодей // Мед. альманах. — 2013. — № 1. — С. 74–78.
2. Баранов, А.А. Современные технологии диагностики и лечения воспалительных заболеваний кишечника / А.А. Баранов, А.С. Потапов, Е.Г. Цимбалова // Вестн. РАМН. — 2011. — № 6. — С. 36–41.
3. Ливзан, М.А. Неспецифический язвенный колит: генетика иммунного ответа / М.А. Ливзан, М.А. Макейкина // Клини. перспективы в гастроэнтерол., гепатол. — 2012. — № 1. — С. 28–33.
4. Никитина, И.Г. Структура и функция кишечных α -дефензинов в норме и патологии / И.Г. Никитина, Ю.А. Букурова, Г.С. Краснов и др. // Мол. биол. — 2012. — Т. 46, № 1. — С. 23–29.
5. Алешина, Г.М. Современная концепция об антимикробных пептидах как молекулярных факторах иммунитета / Г.М. Алешина, В.Н. Кокряков, О.В. Шамова и др. // Мед. академ. журн. — 2010. — № 4. — С. 149–160.
6. Будихина, А.С. Дефензины — мультифункциональные катионные пептиды человека / А.С. Будихина, Б.В. Пинегин // Иммунопатол., аллергол., инфектол. — 2008. — № 2. — С. 31–40.
7. Chu, H. Human α -Defensin 6 Promotes Mucosal Innate Immunity Through Self-Assembled Peptide Nanonets / H. Chu, M. Pazgier, G. Jung et al. // Science. — 2012. — Vol. 337, № 6093. — P. 477–481.
8. Steinstraesser, L. Host defense peptides and their antimicrobial immunomodulatory duality / L. Steinstraesser // Immunobiology. — 2010; doi:10.1016/j.imbio.2010.07.003
9. Bahri, R. Candida famata modulates toll-like receptor, beta-defensin, and proinflammatory cytokine expression by normal human epithelial cells / R. Bahri, D. Saidane-Mosbahi, M. Rouabhia // J. Cell. Physiol. — 2010. — Vol. 222, № 1. — P. 209.
10. Kim, J.Y. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity / J.Y. Kim, S.C. Park, I. Hwang et al. // Int. J. Mol. Sci. — 2009. — Vol. 10. — P. 2860.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ

КЛИНИЧЕСКАЯ ИНФОРМАТИВНОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ АЛЬФА- И БЕТА-ДЕФЕНЗИНОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ У БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

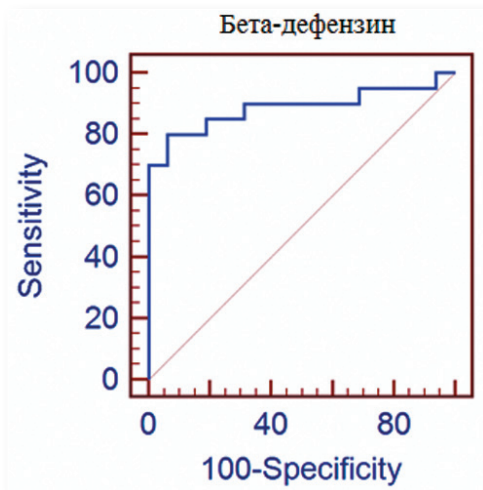


Рис. 1. ROC-кривая (соотношение чувствительности и специфичности) для прогнозирования развития ВЗК по уровню β -дефензина кала

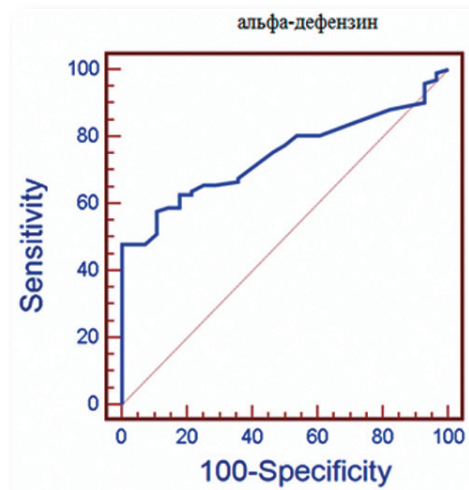


Рис. 2. ROC-кривая (соотношение чувствительности и специфичности) для прогнозирования развития ВЗК по уровню α -дефензина крови